



รายงานการวิจัย

การใช้ยีสต์จากกระเพาะโคเสริมในอาหารสัตว์ต่อการลดความเป็นพิษ ของสารพิษจากเชื้อราในไก่กระທ (Utilization of Ruminant Yeast Added to Diet to Reduce Toxicity of Toxin from Fungi in Broilers)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การใช้ยีสต์จากกระเพาะโคเสริมในอาหารสัตว์ต่อการลดความเป็นพิษ ของสารพิษจากเชื้อราในไก่กระທ (Utilization of Ruminal Yeast Added to Diet to Reduce Toxicity of Toxin from Fungi in Broilers)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-50

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาความสามารถในการดูดซับ aflatoxin ของยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า ได้ทำการศึกษาการใช้ยีสต์จากกระเพาะโค ยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า ใน 2 การทดลอง กล่าวคือ การทดลองที่ 1 ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กลุ่ม การทดลอง (treatment) กลุ่มการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว โดยใช้ด้วยยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า มีรายละเอียดดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) ไม่ใส่ยีสต์ เดิม aflatoxin B₁ 100 ppb กลุ่มที่ 2 การดูดซับ โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ทางการค้า เดิม aflatoxin B₁ 100 ppb กลุ่มที่ 3 การดูดซับ โดยใช้ *Candida sp.* ทางการค้า เดิม aflatoxin B₁ 100 ppb กลุ่มที่ 4 การดูดซับ โดยใช้ Mannanoligosachharide (MOS) เดิม aflatoxin B₁ 100 ppb และ กลุ่มที่ 5 การดูดซับ โดยใช้ยีสต์จากกระเพาะโค เดิม aflatoxin B₁ 100 ppb ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค มีความสามารถในการดูดซับ aflatoxin B₁ กว่ายีสต์ *Candida sp.* และ MOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยีสต์ *Candida sp.* มีความสามารถในการดูดซับ aflatoxin B₁ สูงกว่า MOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน ความสามารถในการดูดซับ aflatoxin B₁ เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ *S. cerevisiae* ยีสต์จากกระเพาะโค *Candida sp.* และ MOS ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin B₁ ด้วยยีสต์ทางการค้า หรือยีสต์จากกระเพาะโค ในไก่กระทอง โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการผลิต โดยใช้ไก่กระทองพันธุ์ Arbor Acer อายุ 1 วัน จำนวน 600 ตัวมาเลี้ยงในโรงเรือน อาหารที่ให้ไก่กินเป็นอาหารที่ใช้ในทางการค้า (starter) ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 23% พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ 3,000 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้กินอย่างเต็มที่ (ad libitum) ตลอดจนอายุ 21 วัน เมื่อไก่อายุได้ 21 วันทำการสุ่มลูกไก่ออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว กลุ่มการทดลองประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่ได้เสริมยีสต์ และ AFB₁) กลุ่มที่ 2 เสริม 250 ppb AFB₁ กลุ่มที่ 3 เสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ทางการค้า (commercial yeast; CY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁ และกลุ่มที่ 4 เสริมยีสต์จากกระเพาะโค (bovine yeast; BY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁ ผลการทดลองพบว่าไก่กินได้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อน AFB₁ จะทำให้ไก่กินได้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามในไก่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายน้อยที่สุดไม่ทำให้น้ำหนักตัว เพอร์เซ็นต์ซาก น่อง และออกแตกต่างกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ แต่กลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อน AFB₁ ทำให้เพอร์เซ็นต์ตับและเพอร์เซ็นต์ไขมันช่องท้องเพิ่มขึ้น และมีเพอร์เซ็นต์น่องต่ำที่สุดพบว่าไม่มีผลต่อระดับ

total protein, albumin, blood urea nitrogen และ glucose ในเลือด การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระทองที่มีการปนเปื้อน AFB₁ ช่วยทำให้ cholesterol และ triglycerides ในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ไก่กระทองที่ได้รับ AFB₁ โดยไม่ได้เสริมยีสต์จะมีความเข้มข้นของ cholesterol และ triglycerides ในเลือดลดลง

ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การเสริมยีสต์มีชีวิตในอาหารไก่กระทองที่มีการปนเปื้อน AFB₁ สามารถช่วยปรับปรุงสมรรถนะการผลิตของไก่กระทองได้

Abstract

The present research studied the mycotoxin adsorbent ability of commercial yeasts, bovine ruminal yeast and commercial yeast product in 2 experiments. The first experiment was conducted to determine the adsorbent ability of commercial yeasts, yeast from the rumen and commercial yeast cell wall in CRD with 5 experimental groups, 4 replicates; including the 1st group, 100 ppb AFB₁ and no yeast or yeast product; the 2nd group, 100 ppb AFB₁ + commercial *Saccharomyces cerevisiae*; the 3rd group, 100 ppb AFB₁ + commercial *Candida sp.*; the 4th group, 100 ppb AFB₁ + MOS; and the 5th group, 100 ppb AFB₁ + bovine *S. cerevisiae*. The results revealed that commercial and bovine yeasts were significantly superior to commercial *Candida sp.* and MOS, while commercial *Candida sp.* had significantly higher adsorbent ability than MOS. Adsorbent ability in ascending order were commercial *S. cerevisiae*, bovine yeast, commercial *Candida sp.* and MOS respectively.

The objective of the 2nd experiment was to studied the adsorbent ability of commercial *S. cerevisiae* and bovine yeast in broilers. Six hundred one day old, mixed sex, Arber Acre chicks were raised in the same shed and the diet was commercial starter with approximately 23% CP and 3,000 kcal/kg of ME. Chicks were fed ad libitum throughout the 21 days period. At 21 days of age, chicks were randomly assigned into 4 groups with 6 replicates and 20 chicks per replicate. The treatments included the control group (no AFB₁ and no yeast or yeast product), the 2nd group was 250 ppb AFB₁, the 3rd group, commercial (*S. cerevisiae*) yeast (CY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁ and the 4th group, bovine yeast (BY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁. The results showed that addition of yeasts resulted in similar feed intake, ADG and FCR to the control group, however, the yeast unsupplemented group had significantly lower feed intake, ADG and FCR than the control group. Broilers in the control group showed the lowest mortality rate. Supplementation of yeasts did not cause the differences in carcass, drumstick and breast from the control group and the yeast unsupplemented group. However, the yeast unsupplemented group with AFB₁ increased percentages of liver and abdominal fat and showed the lowest percentage of drumstick.

Serum total protein, albumin, blood urea nitrogen and glucose were similar among treatments while yeast addition showed similar cholesterol and triglycerides to the control group. However, AFB₁ without yeast group had a reduction in cholesterol and triglycerides when compared to the control group.

The present study clearly indicated that yeast supplementation had a beneficial effect on performance of broilers.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ไทย).....	ก
บทคัดย่อ ..(อังกฤษ).....	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 การศึกษาปริมาณการดูดซับสารอะฟลาท็อกซิน ในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>) ด้วยยีสต์ หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า.....	18
3.1 บทนำ.....	18
3.2 วัตถุประสงค์.....	18
3.3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	18
3.4 ผลการทดลอง.....	25
3.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	26
บทที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับสารอะฟลาท็อกซินด้วยยีสต์ทางการค้าหรือยีสต์ จากกระเพาะโค ในไก่กระทอง.....	28
4.1 บทนำ.....	28
4.2 วัตถุประสงค์.....	28
4.3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
4.4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	32
4.5 สรุปผลการทดลอง.....	37
เอกสารอ้างอิง.....	38
ประวัติผู้วิจัย.....	43

สารบัญตาราง

Table	หน้า
2.1 คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของอะฟลาท็อกซินชนิดต่างๆ	5
2.2 ชนิดของเชื้อรา.....	6
2.3 ระดับความเข้มข้นและผลของสารพิษอะฟลาท็อกซินในสัตว์ปีก.....	9
2.4 กำหนดระดับอะฟลาท็อกซิน (หน่วย : ppb.) ที่ผ่านการพิจารณาของอนุกรรมการฯ..	11
2.5 ส่วนประกอบของยีสต์ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	13
2.6 ผลการเสริม <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ลงในสูตรอาหารไก่เนื้อต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร.....	14
2.7 ผลการเสริม <i>S. cerevisiae</i> เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์ปีกต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการผลิต.....	16
3.1 Number of commercial yeast and ruminal yeast counted haemocytometer	21
3.2 Aflatoxin B ₁ (AFB ₁) <i>in vitro</i> after incubation by yeasts and yeast products.....	25
3.3 Adsorption ability of aflatoxin B ₁ (AFB ₁) by yeasts and yeast products	26
4.1 Ingredient and calculated nutrient composition of basal diets (as-fed basis).....	32
4.2 Effect of yeast supplementation on performances of broilers	34
4.3 Effects of yeast supplementation on live weight and percentages of carcass, liver, abdominal fat, drumstick, thigh and breast	35
4.4 Effects of yeast supplementation on blood parameters	37

สารบัญภาพ

Figure		หน้า
1	โครงสร้างของอะพลาทอกซินชนิดต่างๆ.....	4
2	การเปลี่ยนแปลงของสารพิษอะพลาทอกซินในตับ.....	8

บทที่ 1

บทนำ

ปัญหาสำคัญในการผลิตอาหารสัตว์ในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย คือ คุณภาพวัตถุดิบที่จะนำมาประกอบเป็นสูตรอาหารสัตว์ ต้องนำเอาแหล่งคุณค่าทางโภชนาการต่างๆ มาประกอบเพื่อให้ได้มาถึงความสมดุลและเหมาะสมสำหรับเลี้ยงสัตว์แต่ละระยะ วัตถุดิบที่สำคัญในการนำมาประกอบเป็นสูตรอาหารสัตว์ในปัจจุบันมีทั้งผลิตได้ภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ วัตถุดิบหลักๆ ก็คือ ประเภทรายพืช ซึ่งได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ปลายข้าว โปรตีนจากพืช ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากทานตะวัน และกากพืชอื่นๆ ที่นำมาทดแทนกากถั่วเหลือง โปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น เนื้อกระดูกป่น ปัญหาหลักที่สำคัญของวัตถุดิบ ที่นำมาผลิต คือ mycotoxins (ภทนิย, 2540)

Mycotoxins คือ สารพิษที่สร้างจากเชื้อราที่เจริญเติบโต ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อราและสารพิษที่เกิดขึ้นในวัตถุดิบอาหารสัตว์สามารถเกิดได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่ระหว่างการผลิต การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาในคลังสินค้า หรือขณะลำเลียงเพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ สารพิษจากเชื้อราไม่เพียงแต่ทำให้ปริมาณผลผลิตของวัตถุดิบต่อไร่ลดลง แต่ยังมีผลกระทบต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ตลอดจนเกิดสารตกค้างในเนื้อสัตว์อันเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เชื้อรา 3 ชนิดหลักที่สร้างสารพิษ คือ *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* เชื้อราบางสายพันธุ์จะสร้างสารพิษได้เมื่อสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง และอื่นๆ (ภทนิย, 2540)

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อรา อุณหภูมิที่เชื้อรา *A. flavus* สร้าง aflatoxin ได้คือ 12 – 41 °C ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่าง 25 – 32 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 86 – 87% (ภทนิย, 2540) aflatoxin จาการเป็นกลุ่มสาร metabolites ที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งทำให้เกิด primary hepatocellular carcinoma (เขาวมาลย์ และคณะ, 2540) และก่อการกลายพันธุ์สามารถทำให้เกิดอาการเป็นพิษต่อร่างกายของคนและสัตว์ สัตว์ที่ได้รับวัตถุดิบที่มี aflatoxin จะทำให้สัตว์ป่วยเป็นโรคต่างๆ ได้ง่าย เนื่องจากอาหารที่มี aflatoxin จะทำลายระบบภูมิคุ้มกัน ปัญหาจากสารพิษจากเชื้อราที่มีต่อสัตว์ไม่ได้หยุดลงแค่สัตว์ไม่กินอาหารหรือเจริญเติบโตและให้ผลผลิตเท่านั้นสารพิษจากเชื้อรายังถ่ายทอดไปสะสมในเนื้อ นม ไข่ หรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากสัตว์ได้ ซึ่งนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ด้วยเช่นกัน ดังนั้นปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ aflatoxin ในอาหารสัตว์ปศ เป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสัตว์ปีกจะมีความไวต่อสารพิษชนิดมากกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของยีสต์ (yeast) ที่เสริมในอาหารสัตว์ปีก เพื่อลดความรุนแรงจากการเป็นพิษของ aflatoxin ในไก่กระທ

บทที่ 2

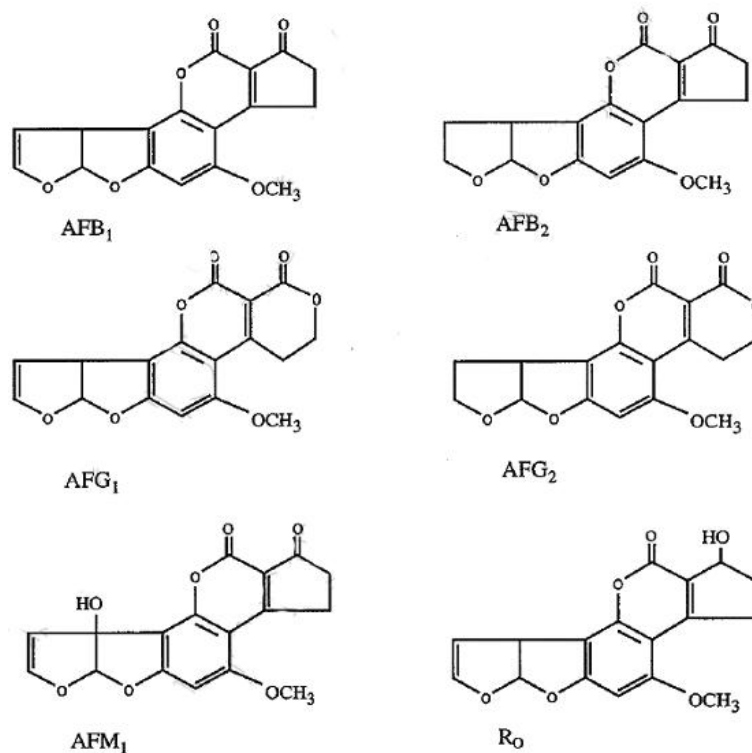
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aflatoxin

Aflatoxin ผลิตโดยเชื้อรา *A. Flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* นอกจากนี้ *A. ruber*, *A. wenti*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. ostianus*, *A. ochraceus*, *A. tamaris*, *Penicillium puberrulem*, *P. variable*, *P. citrinum*, *P. frequentans* และ *Rizopus sp.* ยังสามารถผลิต aflatoxin ได้เช่นกัน สภาพที่เอื้ออำนวยต่อการสร้าง aflatoxin ได้ดีจะต้องมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-85 เปอร์เซ็นต์ (percent, %) ความชื้น 17% และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 24-35°C ระบุว่าไม่สามารถเจริญในสภาพที่มีความชื้นต่ำกว่า 12% ดังนั้นปัญหาการปนเปื้อนจึงเกิดขึ้นบ่อยในเขตที่มีอากาศอบอุ่นไปถึงเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย

สูตรโครงสร้างของ aflatoxin

Aflatoxin เป็นสารเคมีที่เป็นอนุพันธ์ของ coumarin ต่อกับ bifuran ในกรณีของ AFB₁ จะมี cyclopentanone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา ในกรณีของ aflatoxin G₁ จะมี 6-member lactone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา เมื่อ furan ring ของ AFB₁ และของ AFG₁ เกิด saturation ด้วยไฮโดรเจน 2 อะตอม จะเกิดเป็น AFB₂ และ AFG₂ ซึ่งความเป็นพิษจะน้อยกว่า AFB₁ และ AFG₁ สำหรับ AFM₁ และ AFM₂ เกิดจากการเติมไฮดรอกซิล 1 หมู่ เข้าที่ตำแหน่ง 4 ของ furan ring ใน AFB₁ และ AFB₂ แต่ถ้าเติมหมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าวเข้าที่ตำแหน่งที่ 2 ของ furan ring ใน AFB₁ และ AFG₂ จะเกิดเป็น AFB_{2a} และ AFG_{2a} (ภาพที่ 1) ตามลำดับ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ aflatoxin ชนิดต่างๆ

คุณสมบัติของ aflatoxin

1. สามารถเรืองแสงได้ภายใต้แสง ultraviolet ขนาดความยาวคลื่น 365-366 nanometre
2. ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เคมี เช่น methanol, ethanol, chloroform และ acetone
3. จุดหลอมตัวของ aflatoxin คือ 250 °C ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันช่วยเพื่อที่จะทำลาย aflatoxin ไม่ค่อยได้ผลเท่าที่ควร แต่อย่างไรก็ตาม aflatoxin อาจจะถูกทำลายไปได้บ้างด้วยแสง และความร้อนในรูปต่างๆ กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลา และอุณหภูมิ (ชาญยุทธ และ อุทัย, 2538)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของaflatoxinชนิดต่างๆ

ชนิดของaflatoxin	สูตรโครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว (C°)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268 – 269
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	486 – 289
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 – 246
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237 – 240
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293

ชนิดของ aflatoxin

Aflatoxin มีหลายชนิด คือ AFB₁, B₂, B_{2a}, G₁, G₂, G_{2a}, GM₁, M₁, M₂, P₁, Q₁ และ R₀ ชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงได้แก่ AFB₁, B₂, G₁ และ G₂ รา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถผลิต AFB₁ ในปริมาณที่สูงกว่าสารพิษชนิดอื่นๆ AFB₁ มีพิษร้ายแรงมากที่สุด และเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับของสัตว์ทดลองได้ดีที่สุด รองลงมาคือ G₁, B₂ และ G₂ สำหรับ AFM₁ และ M₂ เป็นเมทาโบไลต์ของ AFB₁ และ B₂ มักพบในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับ AFB₁ และ B₂

ตารางที่ 2.2 ชนิดของเชื้อรา

Types of fungi	Aflatoxins
<i>Aspergillus flavus</i> Link	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>A. flavus</i> var. <i>Columnaris</i>	B ₁ , G ₁
<i>A. niger</i> var. <i>Teieghem</i>	B ₁
<i>A. ostianus</i> Wehmer	B ₁
<i>A. parasiticus</i> Speare	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>A. rubber</i> Thom a. Church	B ₁
<i>A. wentii</i> Wehmen	B ₁
<i>Penicillium citrium</i> Thom	B ₁
<i>p. frequentans</i> Westling	B ₁
<i>P. puberulum</i> Bainier	B ₁ , G ₁
<i>P. variable</i>	B ₁

ที่มา : ชาญยุทธ และ อุทัย. (2538)

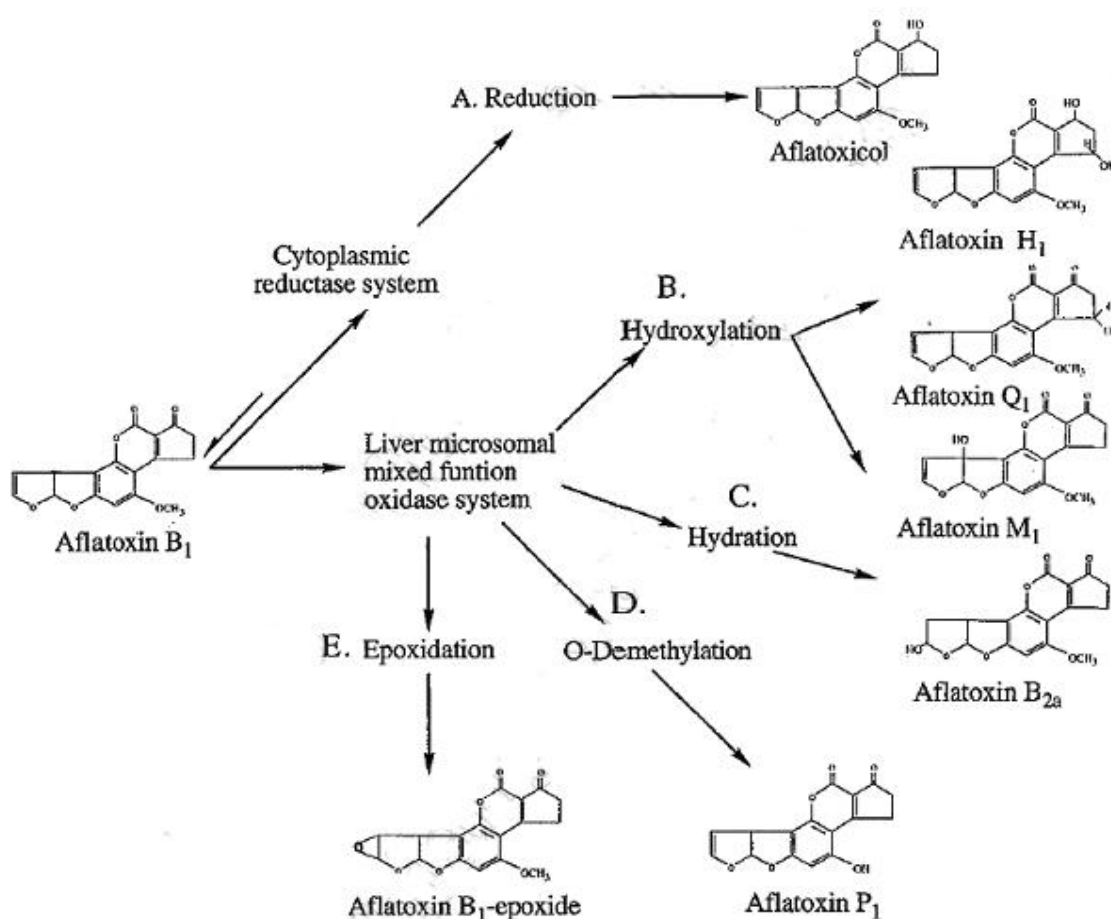
กระบวนการสังเคราะห์ aflatoxin ในเชื้อรา

กระบวนการสังเคราะห์ aflatoxin โดยรา มี acetate และ manolate เป็น สารตั้งต้นแหล่งธาตุอาหารที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน นอกจากนี้การเพิ่มธาตุโลหะบางชนิด เช่น Fe Mg และ Cd ช่วยเพิ่มการสร้าง aflatoxin acetate และ manolate ถูกกระตุ้นด้วย coenzyme A กลายเป็น acetyl-CoA และ malonyl-CoA พร้อมทั้งมีการปล่อย CO₂ ในปฏิกิริยารวมตัวทุกครั้ง acetyl group จะถูกเติมลงไปบน intermediate ketide จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงแหวนที่มีคาร์บอน 20 ตัว ได้ C₂₀ polyketide สารตัวกลางนี้จะถูก decarboxylate และถูก oxidize มีปฏิกิริยาหลายขั้นตอนผ่านตัวกลางอย่างน้อยอีก 4 ชนิด กลายเป็น stericmatocytin และ aflatoxin ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของ aflatoxin ในร่างกาย

Aflatoxin เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็ก ประมาณ 10–20 % และจะถูกกำจัดออกจากร่างกายประมาณ 80–90% โดยจะถูกกำจัดออกทางมูลมากที่สุด คือ ประมาณ 50-60% และในปัสสาวะประมาณ 20-30% สำหรับ aflatoxin ที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ นั้น พบว่ามีการสะสมมากที่สุดในระดับไต ส่วนในอวัยวะอื่นมีปริมาณต่ำกว่า 0.1% ดังนั้น aflatoxin จึงเป็นพิษต่อตับมากที่สุด และ aflatoxin ถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เกือบหมดในระยะเวลา 24

ชั่วโมเมนต์ โดยจะไม่มีการสะสมภายในร่างกาย เมื่อสัตว์ได้รับ aflatoxin เข้าไปเพียงครั้งเดียว แต่อาจมีการสะสมได้เช่นกัน ถ้าหากได้รับ aflatoxin เข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่อง ภายหลังการถูกดูดซึม aflatoxin จะเข้ารวมตัวกับ albumin ใน serum สารบางตัวจะถูกขับออกนอกร่างกายทางปัสสาวะ น้ำดี และอุจจาระ บางส่วนจะถูกเก็บไว้ในเซลล์ตับ AFB₁ จะถูกเปลี่ยนแปลงใน cytosol เป็น aflatoxinol ใน mycrosome AFB₁ จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น aflatoxin ชนิด M₁, P₁, Q₁ และ epoxide (รูปที่ 2) aflatoxin 8,9 epoxide จะมีความไวมาก สามารถรวมตัวกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น DNA, RNA และโปรตีนอย่างรวดเร็ว Spron และคณะได้รายงานว่า aflatoxin จะเกาะกับ DNA ในรูป aflatoxin-DNA ในอัตรา 1: 170 ทำให้ DNA ไม่สามารถทำงานได้ DNA ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาจะถูก aflatoxin จับไว้หมด Clifford and Rees (1966, 1967) ได้ให้รายงานเกี่ยวกับกลไกในการออกฤทธิ์ของ aflatoxin ภายหลังที่เข้าไปในสิ่งมีชีวิต (organism) ต่างๆ ดังนี้ aflatoxin เข้าไปในเซลล์และส่วนที่เป็น nuclease หลังจากนั้นจะเข้าไปจับกับ DNA ขัดขวางการเกิด DNA-replication ทำให้อัตราการสร้าง RNA ลดลงเนื่องจาก mRNA ถูกยับยั้ง ภายหลังที่ aflatoxin เข้าไปในเซลล์นาน 15 นาที ขบวนการสร้างโปรตีนจะหยุดลงเนื่องจากการสร้าง mRNA และการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ถูกยับยั้ง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ในเวลาต่อมา Ueno รายงานว่า aflatoxin ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อยู่ในรูปของ epoxide จะมีความว่องไวมากในการที่จะเข้าไปรวมตัวกับโปรตีน DNA และ RNA ทำให้ DNA เกิดการเสียหายหรือถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทำหน้าที่ไม่ได้โดยเฉพาะ polymerase ทำให้การสร้าง DNA และ RNA ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Wogan และ Friedman (1968) รายงานว่า aflatoxin เมื่อถูกดูดซึมที่ตับจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น epoxide ซึ่งรวมตัวกับ DNA และ RNA และจะทำให้เอนไซม์ DNA, RNA polymerase ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติจึงทำให้การสร้าง DNA และ RNA ลดน้อยลง



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของ aflatoxin ในตับ

ความเป็นพิษของ aflatoxin ในสัตว์ปีก

ความเป็นพิษของ aflatoxin ต่อไก่

ไก่มีความทนทานต่อความเป็นพิษของ aflatoxin ได้ดีกว่าสัตว์ปีกชนิดอื่นมาก วิรัชและคณะ (2525) รายงานว่าไก่กระทงที่ได้รับอาหารที่มี aflatoxin ระดับไม่เกิน 0.8 ppm มีการเจริญเติบโตดีกว่าไก่กระทงที่ได้รับอาหารที่มี aflatoxin ระดับ 1.6 และ 2.4 ppm และมีแนวโน้มว่าเมื่อระดับ aflatoxin ในอาหารสูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารและปริมาณอาหารที่กินลดลง การเปลี่ยนแปลงของตับ Asplin และ Carnaghan (1961) รายงานว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี aflatoxin เนื้อตับจะมีการเสื่อมโดยมีสีซีด และมีตุ่มเนื้อออกกระจายทั่วไปตามผิวนอกของตับ และเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเดิมติดต่อกันเป็นเวลา 4 เดือน สามารถพบการขยายตัวและการบวม น้ำของต่อมน้ำเหลืองทั่วร่างกาย

Carnaghan et al., (1966) รายงานว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี aflatoxin ระดับ 1.5 ppm จะมีการเจริญเติบโตต่ำ เมื่อเลี้ยงไป 1 สัปดาห์ ทำการสุ่มไก่ฆ่า พบว่าตับของไก่มีสีซีดขยายใหญ่ และบางรายพบจุดเลือดออกแบบห้วเข็มหมุดกระจายทั่วไปในตับ ในการศึกษาระดับเซลล์พบว่าในวันที่

3.5 ของการทดลอง พบการสะสมของไขมันรอบๆ หลอดเลือดของไต และจะพัฒนาต่อไปในระยะ 3-4 สัปดาห์แรก โดยไขมันจะกระจายไปสะสมบริเวณเนื้อตายของตับ นอกจากนี้ยังพบการขยายตัวของท่อน้ำดีและการเพิ่มจำนวนของเนื้อเยื่อเส้นใยในตับอย่างรวดเร็ว ในสัปดาห์ที่ 6-8 ของการทดลอง พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวอย่างรวดเร็ว ต่อมน้ำเหลืองขยายตัวและมีการบวมขึ้น

ความเป็นพิษของaflatoxinต่อเปิด

ลูกเปิดมีความต้านทานต่อความเป็นพิษของ aflatoxin ต่ำมาก สัตว์จะมีอาการชักและตายในลักษณะหัว คอ และขา บิดไปข้างหน้า (Opisthotonus) จากการผ่าซากจะพบจุดเลือดออกใต้ผิวหนังและอวัยวะภายใน เลือดใสและแข็งตัวยากกว่าปกติ มีการบวมขึ้นรอบๆ หัวใจและหน้าแข็ง ตับสีเหลืองซีดและขยายใหญ่ มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นตามบริเวณเนื้อตายในตับ และท่อน้ำดีขยายใหญ่ขึ้น การขยายใหญ่ของท่อน้ำดีถือได้ว่าเป็นลักษณะที่สำคัญและจำเพาะต่อความเป็นพิษของ aflatoxin ในเปิดและสัตว์ฟันแทะบางชนิด นอกจากนี้ยังพบการอักเสบของลำไส้เล็ก มีการอักเสบและจุดเลือดออกที่ลำไส้ใหญ่ ม้ามมีจุดเลือดออก และเปิดเพศเมียมีอาการอักเสบอย่างรุนแรง และมีจุดเลือดออกสีแดงคล้ำหรือม่วงที่รังไข่

ตารางที่ 2.3 ระดับความเข้มข้นและผลของ aflatoxin ในสัตว์ปีก

ชนิดสัตว์	ความเข้มข้น (ppb)	ผลที่เกิดจากสารพิษ
เปิด	30	เกิดเนื้องอกที่ตับ
ไก่วงว	250	การเจริญเติบโตลดลง
ไก่กระหว	420	น้ำหนักลดลง ตับถูกทำลายระดับปานกลาง ภายในเวลา 3 สัปดาห์
ไก่กระหว	1250	ตับ ม้ามและไต มีขนาดโตขึ้น แต่ขนาดของ Bursa gland และ Thymus gland มีขนาดเล็กลง
ไก่ไข่	5000	เปลือกไข่บาง ส่วนในไก่พ่อแม่พันธุ์ผลผลิตไข่และเปอร์เซ็นต์ฟักลดลง

ปัจจัยที่ทำให้เชื้อราปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์สร้างสารพิษมีดังนี้คือ

1. ชนิดของรา *A. flavus*, *A. paraciticus* และ *A. nomius* จะสามารถสร้าง aflatoxin ได้ดี
2. อุณหภูมิ ราสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25-30 C° *A. flavus*, และ *A. paraciticus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10-43 C° ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 32-33 C° และ aflatoxin จะถูกสร้างขึ้นมาในอุณหภูมิช่วงประมาณ 12-40 C°
3. pH ราจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH ที่กว้างคือ ตั้งแต่ 2-8.5 แต่ส่วนใหญ่จะชอบ pH ที่เป็นกรด *A. paraciticus* สามารถสร้าง aflatoxin ได้ในช่วง pH 6 จะเป็น pH ที่เหมาะสม
4. ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของราถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงจะทำให้ความชื้นสูงด้วย ความชื้นประมาณ 14-30% และความชื้นสัมพัทธ์ 80-100% ดังนั้นการเก็บวัตถุดิบอาหารสัตว์ ควรให้ความชื้นลดลงต่ำกว่า 13% และเก็บวัตถุดิบไว้ในที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา
5. ก๊าซออกซิเจน ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษจากราถ้าลดปริมาณของออกซิเจนหรือเพิ่มปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้การเจริญเติบโตของราต่ำลงและลดปริมาณการสร้างสารพิษ ถ้าลดออกซิเจนโดยการบรรจุหีบห่อหรือการใช้ oxygen scavengers จะสามารถยับยั้งการสร้าง aflatoxin จาก *A. flavus*, และ *A. paraciticus* ได้

ตารางที่ 2.4 กำหนดระดับ aflatoxin (หน่วย : ppb.) ที่ผ่านการพิจารณาของอนุกรรมการฯ

	ระดับที่อนุกรรมการฯ เห็นชอบ	ระดับที่กำหนดตาม ประกาศ	ระดับที่ EU กำหนด
วัตถุดิบ			
กากถั่วลิสง	300	500	20
กากถั่วเหลือง	30	50	50
ถั่วเหลืองอบ (Full fat soybean)	20	-	50
Corn gluten meal	20	-	-
ข้าวโพดเมล็ด ข้าวโพดป่น	50	100	20
รำละเอียด รำหยาบ รำสกัดน้ำมัน	25	50	50
ปลาป่น	20	40	50
ปลาและกระดูกปลาป่น	20	-	50
ขนไก่ป่น	20	-	50
เนื้อป่น เนื้อและ กระดูกป่น	20	-	50
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม กากผลปาล์ม	50	-	20
กากมะพร้าว	50	-	20
มันเส้น มันอัดเม็ด	25	-	50
หัวอาหารสัตว์			
หัวอาหารไก่	30	50	-
หัวอาหารเม็ด	30	40	-
หัวอาหารโคเนื้อ- โคนม (โค-กระบือ)	50	100	-
หัวอาหารสุกร	30	50	-
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป			
อาหารไก่ไข่	30	100	20
อาหารไก่เนื้อ	20	100	20
อาหารเป็ด	20	30	10
อาหารสุกรแรกเกิด-น้ำหนัก 15 กิโลกรัม	30	50	10
อาหารสุกรน้ำหนัก 15 กิโลกรัมขึ้นไป	50	100	20
อาหารโคอายุไม่เกิน 1 ปี	50	100	100 (โคนม)
อาหารโคอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป	80	200	200 (โคนม)

ที่มา : กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. (2546)

วิธีการที่ใช้ในการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษจากรา

1. วิธีทางกายภาพ

การคัดเลือกเมล็ดพืช คัดเมล็ดที่มีรา หรือลักษณะลีบเล็ก น้ำหนักเบา และเปลี่ยนสีจากเดิมออกจากกอง เพราะว่าเมล็ดที่มีลักษณะดังกล่าวมักจะมี aflatoxin ปนเปื้อน

การต้ม การนึ่ง ภายใต้อุณหภูมิ และการทอด อาจลดระดับ aflatoxin ได้บ้าง แต่ต้องใช้ระยะเวลานานและสภาวะที่เหมาะสม

การใช้แสงอัลตราไวโอเลต ในกรณีใช้ได้เฉพาะเมล็ดที่มีการปนเปื้อน aflatoxin ในปริมาณและอยู่ที่ผิวของเมล็ดเท่านั้น

การร่อนเมล็ดธัญพืชเพื่อขจัดเศษฝุ่นละอองออก และการล้าง เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถกำจัดสารพิษออกจากเมล็ดธัญพืชได้ แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดก็คือการเผา ให้เมล็ดผ่านเปลวไฟ

2. วิธีทางเคมี

การใช้ calcium propionate 0.25 % หรือ 0.5 % ของอาหารโดยน้ำหนัก ช่วยลดความเป็นพิษของ aflatoxin ในไก่ที่ได้รับ aflatoxin ปนเปื้อนในอาหาร

การใช้ ammonium carbonate, calcium hydroxide สามารถลดปริมาณ AFB₁ ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้

การใช้ benzoic acid, propionic acid และ ammonium benzoate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ mycelium ของรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

3. วิธีทางชีววิทยา มีดังนี้

การใช้ steroidal hydroxylating และ *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ aflatoxin และ ochratoxin A ให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษได้

การใช้ *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งการสร้าง aflatoxin ของรา *A. parasiticus*

การใช้ยีสต์เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งสามารถใช้ในการลดความเป็นพิษ หรือช่วยในการดูดซับสารพิษจากเชื้อราได้

ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ probiotics กลไกการทำงานของ probiotics นั้นเพื่อปรับปรุงสมรรถภาพในการผลิตสัตว์ โดยมีผลช่วยในการสังเคราะห์วิตามินและสารอาหารสารที่จำเป็น เช่น vitamin B สร้าง metabolite ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษหรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการกำจัดพิษ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ

จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร รักษาภาวะสมดุลของ flora ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ยีสต์มีความสามารถในการหมักย่อยได้ดี โดยเฉพาะ *S. cerevisiae*

S. cerevisiae ประกอบด้วยเอนไซม์มากมาย บางส่วนสามารถถูกปล่อยออกมาในลำไส้ และช่วยในการย่อยอาหารปกติของเอนไซม์ที่สัตว์มีอยู่แล้ว และสามารถย่อยกากที่เอนไซม์ในทางเดินอาหารย่อยไม่ได้ เอนไซม์ที่เหลือจะอยู่ในเซลล์ยีสต์และจะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ยีสต์ถูกทำลาย (เมตตา. 2541) นอกจากนั้นแล้วยีสต์ยังอุดมไปด้วยสารอาหาร โดยเฉพาะโปรตีน (40 – 45%) แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ เช่น vitamin- B complex (Celik et al., 2008)

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของยีสต์ (*S. cerevisiae*)

Moisture	2 – 5 (%)
Crud protein	50 – 52 (%)
True protein	42 – 46 (%)
Nucleic Acid	6 – 8 (%)
Mineral	7 – 8 (%)
Lipids	4 – 7 (%)
Carbohydrate	30 – 37 (%)

ที่มา : Celik et al.(2008)

จากการศึกษาผลของการใช้ *S. cerevisiae* ในอาหารสัตว์ปีก พบว่า *S. cerevisiae* สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวและอัตราการแลกน้ำหนักในสัตว์ปีก Menocel et al.,(2005) ได้ทำการทดลองเสริม *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารไก่เนื้อในอัตรา 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักตัวของไก่ในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีน้ำหนัก 2470, 2558, 2542 และ 2521 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้อัตราการแลกน้ำหนักของกลุ่มที่เสริม *S. cerevisiae* ในสูตรอาหารเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่เสริม *S. cerevisiae* ในสูตรอาหาร มีอัตราการแลกน้ำหนักดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al.,(2005) ที่ได้ทำการเสริม *S. cerevisiae* ระดับต่างๆ ลงในสูตรอาหาร เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* กับกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ปริมาณอาหารที่กินและอัตราการแลกน้ำหนักค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Kemel et al., (2001) ได้รายงานว่

การเสริม *S. cerevisiae* ลงในอาหารไก่เนื้ออายุ 0 ถึง 37 วัน ในระดับ 0 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารนั้น พบว่าการเสริม สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวได้ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อัตราการแลกน้ำหนักมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.6 ทั้งนี้เนื่องจากการที่ *S. cerevisiae* ไปมีผลทำให้ระบบการย่อยอาหาร การนำโภชนะต่างๆ ในอาหารไปใช้ประโยชน์ได้สูงขึ้น ช่วยรักษาภาวะสมดุลของ flora ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ (Menocel et al., 2005)

ตารางที่ 2.6 ผลการเสริม *S. cerevisiae* ลงในสูตรอาหารไก่เนื้อต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

Treatments	Body Weight (g)	Feed consumption (g)	Feed conversion (g)	References
0	2470±14 ²	4708±24	1.93±0.01 ²	Menocel et al., (2005)
0.5	2558±47 ¹	4737±42	1.89±0.02 ¹	
1.0	2524±33 ¹	4684±37	1.88±0.01 ¹	
1.5	2512±26 ¹	4657±34	1.88±0.01 ¹	
0	1405	2556	1.82	Zhang et al., (2005)
0.3	1498	2594	1.73	
1.0	1515	2644	1.75	
3.0	1553	2685	1.73	
0	1761.2±30.98 ^a		1794	Kemel et al., (2001)
0.2	1861.66±40.58 ^a		1780	
0	2589±21 ^c	5105±71 ^c	2.00±0.01	Kemel et al., (2001)
0.25	2647±40 ^b	5143±93 ^{ab}	1.97±0.04	
0.5	2657±41 ^a	5062±98 ^b	1.93±0.04	

^(a,b) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน

^{1,2} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ ($p < 0.01$) ในคอลัมน์เดียวกัน

ผลการเสริม *S. cerevisiae* เพื่อใช้ในการดูดซับ aflatoxin ในอาหารสัตว์ปีก

เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด MOS (MOS) ได้แก่ glucomannan ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับสารพิษกับเชื้อราได้ จากการทดลองใช้ glucomannan ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ ปรากฏว่า glucomannan สามารถจับกับ aflatoxin ได้ถึง 95 % พูโมนิซิน 67% และซีราลีโนน 77 % (Yiannikouris and Jouany., 2002)

Kemel et al. (2003) ได้ทำการทดลองเสริม *S. cerevisiae* (0.2%) ในสูตรอาหารไก่เนื้อร่วมกับ aflatoxin (200 ng/g) พบว่าน้ำหนักตัวของไก่ในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี aflatoxin โดยมีน้ำหนัก 3313, 3160 และ 3037 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yildiz et al., (2004) ที่ได้ทำการทดลองในนกกระทา และการศึกษาของ Parlat et al., (2001) ที่ได้ทำการศึกษานกกระทาเช่นเดียวกัน โดยการทดลองได้ทำการเสริม *S. cerevisiae* ลงในสูตรอาหารร่วมกับ aflatoxin พบว่านกกระทากลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* นั้นมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการใช้อาหารดีขึ้น ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี aflatoxin เพียงอย่างเดียวดังแสดงในตารางที่ 2.7 ทั้งนี้เนื่องจากตรงผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* จะมีการดูดซับ aflatoxin ไว้ ซึ่งสารพิษเหล่านี้จะถูกกำจัดโดยการขับออกมาพร้อมมูลของสัตว์ (Santin et al., 2003)

แต่จากการศึกษาของ Santin et al. (2003) ที่ได้ทำการทดลองเสริม *S. cerevisiae* (0.01%) ลงในสูตรอาหารไก่เนื้อที่มี aflatoxin (500 ppb) ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *S. cerevisiae* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี aflatoxin แล้ว ปรากฏว่าการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่เนื้อทั้ง 3 กลุ่มนั้น มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Santin et al. (2003) ดังแสดงในตารางที่ 2.7 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมของตัวสัตว์ สัตว์จะสามารถต้านทานความเป็นพิษของ aflatoxin ได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น เมื่อสัตว์อยู่ในสภาพที่มีการจัดการทางด้านสิ่งแวดล้อมและการจัดการทางด้านอาหารที่ดี ซึ่งส่งผลทำให้ ความเครียดในตัวสัตว์ลดลงจึงทำให้สามารถต้านทานต่อสารพิษได้มากยิ่งขึ้น (Santin et al., 2003)

ตารางที่ 2.7 ผลการเสริม *S. cerevisiae* เพื่อใช้ในการดูดซับ aflatoxin ในอาหารสัตว์ปีกต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการผลิต

Species	Treatment		Body Weight (g)	Feed Intake (g)	Feed conversion (g)	Reference
	Levels					
	AF (ppb)	SC (%)				
Broiler	0	0	1773 ^b	3160 ^b	1.78	Kemel et al., (2003)
Chicken	2000	0	1661 ^c	3037 ^b	1.82	
	2000	2.0	1860 ^a	3313 ^a	1.78	
Quail	0	0	407.41(3.86) ^b	145.81(0.90) ^b	2.79(0.03)	Yildiz et al., (2004)
	2500	0	296.89(3.18)	91.72(0.98)	3.25(0.05) ^a	
	2500	0.1	494.87(5.47) ^a	168.17(1.11) ^a	2.94(0.03) ^b	
Quail	0	0	38.0(3.24) ^a	31.7(2.01) ^a	3.89(0.2) ^a	Parlat et al., (2001)
	5000	0	23.0(2.94) ^b	22.8(3.22) ^b	7.34(0.86) ^b	
	5000	0.2	38.0(3.81) ^a	29.6(2.23) ^a	3.69(0.2) ^a	
Broiler	0	0	1782	3555	1.998	Santin et al., (2003)
Chicken	500	0	1717	3543	2.063	
	500	0.1	1781	3452	1.941	
Broiler	0	0	2326	4281	1841	Santin et al., (2003)
Chicken	1000	0	1998	3766	1886	
	1000	0.2	2071	3773	1823	

^(a,b) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.05$) ในคอลัมน์เดียวกัน

*หมายเหตุ AF = aflatoxin ; SC = *S. cerevisiae*

ยีสต์จัดอยู่ในกลุ่มของ probiotic มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์แต่ขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีโทษ ทำให้สมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารดีขึ้น สัตว์มีสุขภาพดีและมีสมรรถภาพในการผลิตดีขึ้น จากการศึกษาและรวบรวมเอกสารผลของการเสริม *S. cerevisiae* ในอาหารสัตว์ปีกที่มีการปนเปื้อนของ aflatoxin นั้น พบว่าการเติมยีสต์ลงในอาหารสามารถลดความเป็นพิษของ aflatoxin ได้ ส่งผลทำให้สมรรถภาพการผลิตของสัตว์ดีขึ้น ซึ่งสัตว์มีการเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพใช้อาหารดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรต MOS ได้แก่ glucomannan ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับ

สารพิษกับเชื้อราได้ เมื่อสารพิษจับกับผนังเซลล์ของยีสต์แล้วก็จะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระของสัตว์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า นอกจากยีสต์จะอุดมไปด้วยสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุ ที่เป็นประโยชน์กับตัวสัตว์แล้วยีสต์ยังสามารถช่วยลดซับความเป็นพิษจากสารพิษต่างๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์อีกด้วย และยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวสัตว์และมนุษย์ อันเนื่องจากการเกิดสารพิษตกค้างในตัวสัตว์ หรือจากผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากตัวของสัตว์เอง

แต่สิ่งที่สำคัญที่สุดของการผลิตสัตว์สัตว์ คือ การจัดการทั้งการจัดการทางด้านสิ่งแวดล้อม และการจัดการด้านอาหาร เมื่อสัตว์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดี ได้รับอาหารที่มีคุณภาพ ส่งผลทำให้ความเครียดของสัตว์ลดลง เมื่อสัตว์มีความเครียดต่ำก็จะสามารถต้านทานต่อโรค และสารพิษต่างๆ ได้มากขึ้น ส่งผลต่อสมรรถภาพในการผลิตของสัตว์ ทำให้สัตว์มีสมรรถภาพในการผลิตสูงขึ้น

บทที่ 3

การศึกษาปริมาณการดูดซับสาร aflatoxin ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

ด้วยยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า

3.1 บทนำ

aflatoxin เป็นสารพิษที่พบว่ามี การปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์แทบทุกชนิด ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน aflatoxin นี้มักพบว่าเป็นอันตรายต่อประสิทธิภาพการผลิตสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีกที่ตอบสนองต่อสารพิษได้มากและเร็ว การศึกษาในปัจจุบันพบว่ายีสต์ หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์หลายชนิดสามารถดูดซับ aflatoxin ช่วยลดความเป็นพิษต่อสัตว์ที่ได้รับสารพิษนี้เข้าไป นอกจากนี้ การศึกษายังพบว่า การเติมยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ลงในอาหารสามารถลดความเป็นพิษของ aflatoxin ได้ ส่งผลทำให้สมรรถภาพการผลิตของสัตว์ดีขึ้น ซึ่งสัตว์มีการเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพใช้อาหารดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิด MOS ได้แก่ glucomannan ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับสารพิษกับเชื้อราได้ เมื่อสารพิษจับกับผนังเซลล์ของยีสต์แล้วก็จะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระของสัตว์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า นอกจากยีสต์จะอุดมไปด้วยสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุ ที่เป็นประโยชน์กับตัวสัตว์แล้วยีสต์ยังสามารถช่วยดูดซับความเป็นพิษจากสารพิษต่างๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์อีกด้วย และยังไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวสัตว์และมนุษย์ อันเนื่องจากการเกิดสารพิษตกค้างในตัวสัตว์ หรือจากผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากตัวของสัตว์เอง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำยีสต์จากกระเพาะโคมาใช้ในการลดความเป็นพิษของสาร aflatoxin ในอาหารไก่กระเท่ง งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษากการใช้ยีสต์จากกระเพาะโค ยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้าในการดูดซับสารพิษดังกล่าว

3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับสาร aflatoxin ของยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้าในหลอดทดลอง

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 การเก็บ rumen fluid

การเก็บของเหลวในกระเพาะหมัก ได้จากการสูมเก็บหลังจากที่โคกินอาหาร 3 ชั่วโมง ดังนี้คือ

3.3.1.1 เปิดฝากระบอก fistula ของโคเจาะกระเพาะ ซึ่งโคเจาะกระเพาะนั้น กระเพาะหมักของโคจะถูกเย็บติดกับผนัง แล้วใส่กระบอก fistula ลงไป สามารถเปิดและปิดเพื่อเก็บ rumen fluid และ digesta

3.3.1.2 เก็บ rumen fluid โดยใส่ rumen sampler ไว้ในกระเพาะหมักให้ปลายสาย ข้างโผล่ออกมานอกกระบอก fistula

3.3.1.3 ใช้กระบอกฉีดยา (Syringe) ต่อเข้ากับสายข้าง หลังจากนั้นดูดของเหลว ออกมาประมาณ 200 ml

3.3.1.4 นำ ของเหลวที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ปิดฝาให้แน่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บ rumen fluid ต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

3.3.2 การคัดแยกยีสต์จากกระเพาะโคให้บริสุทธิ์

3.3.2.1 ปิเปตของเหลวที่ได้จากกระเพาะหมัก 25 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 ml

3.3.2.2 นำ ของเหลวจากกระเพาะหมักที่เจือจางแล้ว ไปเจือจางด้วยวิธี serial dilution ในระดับความเจือจาง $1:10$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$

3.3.2.3 ปิเปตตัวอย่าง 0.1 ml แต่ละความเจือจาง หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt yeast extracts (MY)

3.3.2.4 ใช้เทคนิคการแยกเชื้อ spread plate technique

3.3.2.5 นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 39°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.2.6 ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะ colony ที่แตกต่างกัน นำมาทำ wet mount ศึกษาสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำ การคัดแยกยีสต์

3.3.2.7 ใช้ loop เขี่ยยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันของแต่ละ colony นำมาคัดแยก ยีสต์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ streak plate technique ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY

3.3.2.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.2.9 ใช้ loop เขี่ย colony ของยีสต์ที่บริสุทธิ์ นำมาฉีดลากบนอาหาร MY agar slant

3.3.2.10 เก็บยีสต์ที่เจริญบนอาหาร MY agar slant ที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.3 การคัดแยกยีสต์ทางการค้าให้บริสุทธิ์

3.3.3.1 ชั่งยีสต์ทางการค้า 0.5 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ที่บรรจุอาหาร MY broth 100 ml

3.3.3.2 นำขบวนการหมักไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.3 ใช้ loop และ suspension ของยีสต์ มาจีดลากบนผิวหน้าอาหาร MY agar ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ cross streak technique

3.3.3.4 คัดแยกยีสต์ทางการค้า โดยใช้ loop เขี่ย colony ของยีสต์ จีดลากบนอาหารผิวเอียง MY agar slant

3.3.3.5 เก็บยีสต์บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร MY agar slant ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.4 การเพาะเลี้ยงยีสต์

3.3.4.1 ใช้ loop เขี่ยยีสต์ทางการค้าจากหลอดเก็บเชื้อ MY agar slant เต็ม loop จำนวน 2 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ 1 ซึ่งบรรจุอาหาร MY 100 ml และใช้ loop เขี่ยยีสต์จากกระเพาะโคทั้ง 2 ชนิด เต็ม loop ชนิดละ 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ 2 ซึ่งบรรจุอาหาร MY 100 ml

3.3.4.2 นำขวดรูปชมพู่ทั้ง 2 ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.3 นำ ยีสต์ไปนับจำนวนด้วยวิธี direct count โดยใช้ haemocytometer

3.3.5 การนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemocytometer (Singleton, 1992)

3.3.5.1 เจือจางยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะ โค จากการเพาะเลี้ยง ความเจือจาง 10 เท่า โดยปิเปต suspension ของยีสต์ทางการค้า 1 ml ใส่ลงในหลอดที่ 1 ที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 ml และปิเปต suspension ของยีสต์จากกระเพาะ โค 1 ml ใส่ลงในหลอดที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า

3.3.5.2 ปิเปต suspension ของยีสต์จากทั้ง 2 หลอด มานับจำนวนเซลล์ยีสต์ โดยใช้ haemocytometer ซึ่ง haemocytometer มีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ ซึ่ง 1 ช่องใหญ่ ประกอบไปด้วย 16 ช่องเล็ก ดังนั้น 25 ช่องใหญ่ มี 400 ช่องเล็ก พื้นที่ของ haemocytometer 1 ช่องเล็ก มีพื้นที่ $1/400 \text{ mm}^2$ ($0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm}$) และมีความลึก $1/10 \text{ mm}$ (0.1 mm) ดังนั้นมีปริมาตรเท่ากับ $1/4,000 \text{ mm}^3$ (0.00025 mm^3) หรือ $1/4,000,000 \text{ ml}$ (0.00000025 ml)

3.3.5.3 สุ่มนับ 5 ช่องใหญ่ (80 ช่องเล็ก) ได้เซลล์ยีสต์ดังตารางที่ 3.1

Table 3.1 Number of commercial yeast and ruminal yeast counted haemocytometer

ชนิดของยีสต์	Cells/ml
Commercial yeasts	10×10^7
Ruminal yeast	8×10^7

3.3.6 การศึกษาการดูดซับสาร aflatoxin โดยใช้ยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กลุ่มการทดลอง (treatment) กลุ่มการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้ด้วยยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า มีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) ไม่ใส่ยีสต์ เติม aflatoxin 100 ppb

กลุ่มที่ 2 การดูดซับโดยใช้ *S. cerevisiae* ทางการค้า เติม aflatoxin 100 ppb

กลุ่มที่ 3 การดูดซับโดยใช้ *Candida sp.* ทางการค้า เติม aflatoxin 100 ppb

กลุ่มที่ 4 การดูดซับโดยใช้ MOS เติม aflatoxin 100 ppb

กลุ่มที่ 5 การดูดซับโดยใช้ยีสต์จากกระเพาะโค เติม aflatoxin 100 ppb

3.3.6.1 นำอาหารไก่กระตบดให้ละเอียด ผสมให้เข้ากัน ซึ่งอาหารไก่กระตบดใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ขวดละ 50 g จำนวน 20 ขวด เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับ AFB₁ ของ MOS, ยีสต์ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค ที่ระดับ pH 5.8

3.3.6.2 เติมน้ำกลั่นในแต่ละขวด ขวดละ 100 ml ปรับ pH 5.8

3.3.6.3 เติมสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ([Sigma Aldrich Pte. Ltd. Singapore](#)) ใส่ในแต่ละขวด

3.3.6.4 ชั่งผลิตภัณฑ์ดูดซับ MOS 0.25 g ใส่ในขวดชุดการทดลองใช้ MOS

3.3.6.5 ตรวจนับจำนวนยีสต์โดยใช้ haemocytometer

3.3.6.6 เจือจางยีสต์ทางการค้าแต่ละชนิดและยีสต์จากกระเพาะโค ให้มีความเข้มข้น 2.5×10^7 cells/ml

3.3.6.7 ปิ่เปิด suspension ของยีสต์ทางการค้าแต่ละชนิด และยีสต์จากกระเพาะโค ที่มีความเข้มข้น 2.5×10^7 cells/ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขวดรูปชมพู่ละ 1 ml ในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อให้ในแต่ละ ขวดรูปชมพู่ของชุดการทดลองมีปริมาณยีสต์ 2.5×10^7 cells

3.3.6.8 นำ ขวดรูปชมพู่ในแต่ละชุดการทดลอง ไปบ่มที่อุณหภูมิ 39°C ระยะเวลา 2 วันเมื่อครบระยะเวลา นำอาหารในแต่ละชุดการทดลอง มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ AFB₁

3.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ วิธีการสกัดและวิเคราะห์ ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (Scott, 1990) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.3.7.1 เครื่องมือ

1) เครื่อง HPLC ของบริษัท Thermo Separation Products (TSP) ซึ่งประกอบไปด้วย pump รุ่น P4000, เครื่องฉีดอัตโนมัติ (auto-injection) รุ่น AS3000 และ fluorescence detector รุ่น FL3000

2) Liquid chromatography column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร (millimeter, mm) x ความยาว 25 เซนติเมตร (centimeter, cm) ของบริษัท Waters Spherisorb

3) Chromatography column

4) เครื่องเขย่า (shaker)

3.3.7.2 สารเคมี

1) สารละลายมาตรฐาน AFB₁ (บริษัท Sigma)

2) Chloroform

3) Anhydrous sodium sulphate

4) Silica gel 60 ขนาด 0.063-0.2 mm

5) Hexane

6) Diethyl ether

7) Methanol

8) Benzene

9) Acetonitrile

10) Trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 98%

11) Diatomaceous earth

3.3.7.3 การสกัด AFB₁

1) นำตัวอย่างอาหารมาบดให้ละเอียด

2) ชั่งอาหาร 50 กรัม (gram, g) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml

3) เติมน้ำ 25 ml ใส่ diatomaceous earth 25 g

4) เติม chloroform 250 ml

5) ปิดขวดให้สนิทนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที

6) กรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารที่สกัดได้ 50 ml นำไปผ่าน chromatography column เพื่อชะล้างสารที่สกัดได้ให้สะอาด

3.3.7.4 การชะล้างสารที่สกัดให้สะอาดด้วย chromatography column

การเตรียม column

- 1) ใช้ chromatography column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm ความยาว 300 mm ที่มี stopcock บนปลายล่างของ column ด้วยสำลี
- 2) เติม chloroform ประมาณครึ่ง column
- 3) ใส่ anhydrous sodium sulphate 5 g เพื่อรองรับ silica gel
- 4) ใส่ silica gel 10 g กวนให้เข้ากันกับ chloroform
- 5) ชะล้าง silica gel ที่ติดอยู่ข้าง column ด้วย chloroform ปล่อยให้ silica gel ตกลงสู่ก้นของ column เมื่ออัตราเร็วของการตกตะกอนของ silica gel ลดลง ปล่อยให้ chloroform ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของชั้น silica gel ประมาณ 5-7 cm
- 6) ใส่ anhydrous sodium sulphate 15 g
- 7) ปล่อยให้ chloroform ไหลออกจนอยู่เหนือระดับของ anhydrous sodium sulphate ประมาณ 1 cm

การชะล้าง column

- 1) นำตัวอย่างสารที่สกัดได้ 50 ml ผ่าน column
- 2) ล้าง column ด้วย hexane 150 ml ปล่อยให้สารชะล้างออกจนหมด
- 3) เติม diethyl ether 150 ml ปล่อยให้สารชะล้างออกจนหมด
- 4) ชะล้าง AFB₁ ออกจาก column โดยใช้สารผสมระหว่าง chloroform: methanol (97:3 v/v) 150 ml เก็บสารที่ถูกชะออกจาก column จนหมด
- 5) นำ ไประเหยบนอ่างน้ำเดือด ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง
- 6) ล้างด้วย chloroform ถ่ายลงสู่หลอดแก้วขนาดเล็ก แล้วระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า
- 7) เติม 98% TFA 50 ไมโครลิตร (microliter, μ l) ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า
- 8) เติม methanol 1 ml ถ่ายลงสู่หลอดแก้วขนาดเล็ก เพื่อเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁

3.3.7.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

การเตรียม mobile phase

1) เตรียม 0.05% TFA: acetonitrile: methanol (65:20:15 v/v/v) โดยใช้ปริมาณสารดังนี้ ปิเปต 98% TFA 0.5 ml ใส่ในน้ำกลั่น 1,000 ml ใช้ปริมาตร 650 ml: acetonitrile 200 ml: methanol 150 ml

2) นำ mobile phase ไปกรองผ่านชุดกรองสารละลายขนาดอนุภาค 0.45 μm

การปรับตั้งค่าของเครื่อง HPLC

1) เตรียม column ชนิด reversed phase column C18 Spherisorb 5 ODS 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm x ความยาว 25 cm ต่อเข้ากับเครื่อง HPLC

2) ตั้งค่า flow rate ของ mobile phase 1 ml/min

3) ล้าง column ด้วย mobile phase ประมาณ 5 ชั่วโมง

4) ตั้งค่า fluorescence detector ตรวจวัดที่ excitation wavelength 364 nm และ emission wavelength 424 nm

5) ระยะเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน AFB₁

1) ละลายสารมาตรฐาน AFB₁ 1 mg ใน benzene: acetonitrile (98:2 v/v) ปริมาตร 100 ml ทำให้สารละลายมาตรฐาน AFB₁ มีความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$

2) ปิเปต สารละลายมาตรฐาน 20 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

3) เติม 98% TFA 50 μl ระเหยแห้งโดยใช้แก๊สเป่า

4) ละลายสารละลายมาตรฐานด้วย methanol 2 ml ได้สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น 100 ppb

5) เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ppb ในตัวทำละลาย methanol ความเข้มข้นละ 1 ml โดยวิธีการเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 100 ppb

การฉีดสารละลาย

1) ฉีดสารละลายมาตรฐาน AFB₁ ความเข้มข้นละ 40 μl สารละลายมาตรฐานถูกชะล้างออกมาเป็นเวลา 9 นาที

2) นำ ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานมาคำนวณค่าสมการในการวิเคราะห์ปริมาณ AFB₁ ในตัวอย่าง

3) ฉีดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 40 μl

4) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมาคำนวณเปรียบเทียบกับค่าสมการพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน AFB₁

5) วิธีการสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณ AFB₁ มีค่า % recovery เท่ากับ 76%

3.4 ผลการทดลอง

ระดับความเข้มข้นของ AFB₁ *in vitro* หลังจากการบ่มด้วยยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 กลุ่มควบคุมจะมีระดับความเข้มข้นของ AFB₁ (107.55 ppb) และสูงกว่าระดับที่เดิมลงไปในการอาหาร (100 ppb) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการอาหารไก่ไข่อาจมีสาร AFB₁ อยู่ก่อนแล้ว หลังจากการบ่มด้วยยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า สาร AFB₁ ลดลงในทุกกลุ่มการทดลองที่เสริมยีสต์หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์ทางการค้า Live yeasts (*S. cerevisiae*, *Candida sp.* and yeasts from bovine rumen) มีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษสูงกว่า MOS. เปอร์เซ็นต์การดูดซับสาร aflatoxin ด้วยยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์แสดงไว้ในตารางที่ 3.3 ยีสต์ *S. cerevisiae* ทางการค้า และยีสต์จากกระเพาะโค มีความสามารถในการดูดซับสาร aflatoxin สูงกว่ายีสต์ *Candida sp.* และ MOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยีสต์ *Candida sp.* มีความสามารถในการดูดซับสาร aflatoxin สูงกว่า MOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน ความสามารถในการดูดซับสาร aflatoxin เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ *S. cerevisiae* ยีสต์จากกระเพาะโค *Candida sp.* และ MOS ตามลำดับ

Table 3.2 AFB₁ *in vitro* after incubation by yeasts and yeast products.

Treatment	Aflatoxin (ppb)
Control	107.55 ± 8.15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + AFB ₁ 100 ng/ml	15.35 ± 2.06
<i>Candida sp.</i> + AFB ₁ 100 ng/ml	30.18 ± 3.85
MOS + AFB ₁ 100 ng/ml	38.63 ± 4.71
Yeasts from the rumen + AFB ₁ 100 ng/ml	17.23 ± 2.89

Table 3.3 Adsorption ability of AFB₁ by yeasts and yeast products

ยีสต์ หรือผลิตภัณฑ์ยีสต์	% การดูดซับ aflatoxin
MOS + AFB ₁ 100 ng/ml	64.09 ^b
<i>S. cerevisiae</i> + AFB ₁ 100 ng/ml	85.72 ^{ab}
<i>Candida sp.</i> + AFB ₁ 100 ng/ml	71.95 ^b
ยีสต์จากกระเพาะโค + AFB ₁ 100 ng/ml	8-3.98 ^a
% CV	5.92
SEM	4.76
p - value	0.01

3.5 วิจัยผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าความสามารถในการดูดซับสาร aflatoxin เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ *S. cerevisiae* ยีสต์จากกระเพาะโค *Candida sp.* และ MOS ตามลำดับ ได้มีการใช้เทคนิควิธีการต่างๆ ในการศึกษาการจับสารพิษ หรือประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษ วิธีการที่ง่ายที่สุดคือการเตรียมสารพิษบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว ในระบบนี้จะทราบปริมาณของสารพิษที่ทำปฏิกิริยากับสารดูดซับที่ทราบปริมาณในน้ำ ปริมาณสารพิษที่หลงเหลืออยู่ในของเหลวหลังจากการแยกสารดูดซับสารพิษออกแล้ว จะถูกนำไปตรวจหา และสามารถประมาณปริมาณสารพิษที่ถูกดูดซับจากความแตกต่างของปริมาณสารพิษ เนื่องจากสารพิษจากเชื้อราค่อนข้างที่จะไม่ละลายหรือสลายไป การทดสอบดังกล่าวจะทำให้ระดับความเข้มข้นของสารพิษที่ต่ำมาก การใช้เครื่อง high performance liquid chromatographic (HPLC) ที่มีประสิทธิภาพสูง จะทำให้การตรวจหาประสิทธิภาพของสารดูดซับสารพิษจากเชื้อราได้ง่าย แม่นยำและรวดเร็วขึ้น และมีการใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างกว้างขวาง (Ledoux and Rottinghaus, 1999) งานวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิคของ HPLC เช่นเดียวกันในการตรวจวัดการดูดซับ aflatoxin โดยยีสต์และผลิตภัณฑ์ยีสต์ และพบว่ายีสต์มีชีวิตนั้นมีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้ดีกว่า MOS ผลการทดลองนี้สะท้อนให้เห็นว่ายีสต์มีชีวิตมีความสามารถในการดูดซับ aflatoxin ได้สูงกว่า และยีสต์เหล่านี้ให้ผลดีที่ระดับความเข้มข้นของสารพิษในทางเดินอาหารที่ต่ำ ผลการทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษ และสามารถใช้ได้ ในอัตราที่ต่ำ ประสิทธิภาพในการดูดซับและอัตราที่ใช้ต่ำของยีสต์มีชีวิตสามารถดึงดูดการใช้เสริมเพื่อควบคุมความเป็นพิษ Dawson et al. (2001) แนะนำว่าการดูดซับ aflatoxin นั้นยังขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว ประสิทธิภาพการดูดซับสูงสุดพบที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 การศึกษาครั้งนี้ทำการ

ทดลองหาประสิทธิภาพการดูดซับที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 ซึ่งสูงกว่าที่กล่าวมา
อย่างไรก็ตาม ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถให้ผลของประสิทธิภาพการ
ดูดซับที่มากพอสมควร หากใช้ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่านี้ อาจทำให้ประสิทธิภาพการดูด
ซับ จากผลการวิจัยในครั้งนี้ชี้ให้เห็นชัดเจนว่ายีสต์มีชีวิตรอดนั้นมีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้
ดีกว่าการใช้ผนังเซลล์ของยีสต์ อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาที่ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่านี้
และทำการทดลองในตัวสัตว์ด้วย

บทที่ 4

การศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับสาร aflatoxin

ด้วยยีสต์ทางการค้าหรือยีสต์จากกระเพาะโค ในไก่กระทง

4.1 บทนำ

ไก่กระทงเป็นสัตว์ปีกที่มีการให้ผลผลิตมากที่สุด และเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะสามารถส่งออกต่างประเทศได้ทั้งในรูปแบบไก่สดแช่แข็งและอาหารแปรรูป ทำรายได้เข้าประเทศจำนวนมาก การเลี้ยงไก่เนื้อในประเทศไทยได้มีการพัฒนาและส่งเสริมการเลี้ยงที่จากอดีตเป็นการเลี้ยงหลังบ้านให้มาเป็นในรูปแบบอุตสาหกรรมที่มีการนำเอาสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว เข้ามาเลี้ยง มีการนำความรู้ด้านการจัดการฟาร์มมาใช้อย่างมีระบบ นำเครื่องมืออำนวยความสะดวกมาใช้ในฟาร์ม มีระบบที่ควบคุมและป้องกันการเกิดโรค ตลอดจนมีการพัฒนาวิชาการทางด้านอาหารสัตว์ และสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่กระทงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบอาหารสัตว์ในปัจจุบันมักมีการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราหลายชนิด แต่ชนิดที่เป็นปัญหามากที่สุดคือ aflatoxin ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเนื้อไก่ลดลง เกษตรกรจึงนิยมนำผลิตภัณฑ์ดูดซับสารพิษต่างๆ มาใช้ผสมในอาหารไก่กระทง เพื่อลดความเป็นพิษ เช่น สารในกลุ่ม aluminosilicate ยีสต์และผลิตภัณฑ์จากยีสต์ อย่างไรก็ตาม การใช้ยีสต์มีชนิดต่างๆ และผลิตภัณฑ์ยีสต์มีรายงานว่ามีความสามารถในการดูดซับสารพิษแตกต่างกัน การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin ในไก่กระทง โดยใช้ยีสต์มีชนิดจากแหล่งต่างๆ และผลิตภัณฑ์ยีสต์

4.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับสาร aflatoxin ด้วยยีสต์ทางการค้าหรือยีสต์จากกระเพาะโค ในไก่กระทง โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการผลิต

4.3 อุปกรณ์และวิธีการ

4.3.1 การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระทงนั้น ยีสต์ทางการค้าจะเสริมในรูปแบบผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปทางการค้า ส่วนยีสต์จากกระเพาะโคจะผ่านการเตรียมในห้องปฏิบัติการ แล้วนำไปเสริมโดยการเสริมยีสต์ทั้ง 2 ชนิด เสริมในลักษณะ Top dress

4.3.2 การจัดการสัตว์ทดลองและอาหารทดลอง

ใช้ไก่กระทงพันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์อายุ 1 วัน จำนวน 600 ตัว มาเลี้ยงในโรงเรือนเปิดที่มีการปูพื้นด้วยแกลบหนาประมาณ 15 เซนติเมตร กกลูกไก่ด้วยหลอดไฟขนาด 100 วัตต์เป็นเวลา 2

สัปดาห์ และทำการให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ไปจนถึงเริ่มเข้าสู่การทดลอง เมื่อไก่เริ่มเข้าสู่การทดลองที่อายุ 4 สัปดาห์จะลดชั่วโมงการเปิดไฟให้เหลือ 20 ชั่วโมง อาหารที่ให้ไก่กินเป็นอาหารที่ใช้ในทางการค้า (starter) ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 23% พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ 3,000 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้กินอย่างเต็มที่ (ad libitum) ตลอดจนอายุ 21 วัน

เมื่อไก่อายุได้ 21 วัน (649 ± 20 g average live body weight) ทำการสุ่มไก่ออกเป็น 4 กลุ่ม การทดลอง กลุ่มการทดลองละ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว ในแต่ละซ้ำจะใช้ตาข่ายกันเป็นคอกให้แต่ละซ้ำมีอิสระต่อกัน แต่ละคอกมีที่ใส่อาหารและกระปุกน้ำอย่างพอเพียง ไก่กระทงทุกกลุ่มการทดลองอยู่ภายใต้โรงเรือนเดียวกัน กลุ่มการทดลองประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่ได้เสริมยีสต์ และ AFB₁)

กลุ่มที่ 2 เสริม 250 ppb AFB₁

กลุ่มที่ 3 เสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ทางการค้า (commercial yeast; CY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁

กลุ่มที่ 4 เสริมยีสต์จากกระเพาะโค (bovine yeast; BY) 2.5×10^7 cells + 250 ppb AFB₁

อาหารที่ใช้เลี้ยงมีคุณค่าทางโภชนาะเท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง โดยคำนวณสูตรอาหารด้วยการอ้างอิงจากความต้องการโภชนาของ NRC (1994) การให้อาหารไก่กระทงทำการให้อาหารอย่างเต็มที่ โดยจะเติมอาหารเวลา 8.00 น. และ 16.00 น. แต่ในวันที่มีอุณหภูมิสูงจะทำการยกถังอาหารขึ้นในช่วงเวลา 11.00 - 14.00 น. ในทุกกลุ่มการทดลอง เพื่อป้องกันอาการช็อกเนื่องจากความเครียดจากความร้อน

การผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน ทำโดยการหมักข้าวโพดกับรา *A. flavus* นำ Erlenmeyer flasks ที่บรรจุ sterile substrate มาทำการบ่มกับ 2 ml สารละลายที่มีรา บ่มไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อครบ 7 วัน นำ Erlenmeyer flasks ไปใส่ใน autoclave หลังจากนั้นนำ culture material มาอบแห้งใน forced-air oven ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของ AFB₁ โดย Thin layer chromatography และ HPLC ตามหลักการของ AOAC (1995) และ Trucksess et al. (1994) ตามลำดับ เมื่อต้องการเติม AFB₁ ในอาหารไก่กระทง นำผงที่มี AFB₁ เติมลงไปในการอาหารในระดับที่ต้องการ ตามกลุ่มการทดลอง

เมื่อไก่กระทงอายุได้ 42 วันจะทำการฆ่า ถอนขน ซ้าแหละ และตัดแต่งชิ้นส่วนๆ บันทึกน้ำหนักแต่ละชิ้นส่วนที่ทำการศึกษาทุกขั้นตอน รวมทั้งน้ำหนักตับและไขมันช่องท้อง นำข้อมูลที่ได้ มาทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของแต่ละชิ้นส่วนต่อน้ำหนักมีชีวิต

ขั้นตอนการฆ่าเชื้อและ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. อดอาหารก่อนฆ่า 12 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำหนักมีชีวิต
3. ปาดคอเอาเลือดออก แขนงซากไว้ระยะหนึ่งก่อน แล้วจึงชั่งน้ำหนักตัวไก่หลังเอาเลือดออก
4. ลวกน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 นาที
5. ถอนขนแล้วชั่งน้ำหนักตัวไก่หลังถอนขน
6. เอาเครื่องในออก ชั่งตับ และไขมันในช่องท้อง
7. แช่ตัวไก่ในอ่างน้ำแข็ง จนอุณหภูมิซากลดลงมาที่ 8 องศาเซลเซียส
8. แขนงซากไว้ในห้องเย็น 3 องศาเซลเซียสประมาณ 30 นาทีแล้วชั่งน้ำหนักซากเย็น
9. แขนงซากในห้องเย็นต่อจนครบ 24 ชั่วโมงแล้วชั่งน้ำหนักซาก
10. ตัดหัวและชั่งน้ำหนักซากที่เหลือ
11. ตัดคอแล้วชั่งน้ำหนักซากที่เหลือ
12. ตัดแข้งแล้วชั่งน้ำหนักซากที่เหลือ
13. คำนวณเปอร์เซ็นต์ซากจากน้ำหนักซากเย็นที่ปราศจากหัว คอ และแข้งต่อน้ำหนักมีชีวิต

4.3.3 วิธีการทดลองและเก็บข้อมูล

บันทึกข้อมูล ปริมาณอาหารที่กิน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และจำนวนไก่ตาย ทุก 5 วันตลอดระยะเวลาการทดลอง 3 สัปดาห์เพื่อนำไปคำนวณเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร ในระหว่างทำการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างอาหารก่อนกินและตัวอย่างอาหารหลังกินทุกสัปดาห์ เพื่อนำไปหาวัตถุแห้ง โดยนำตัวอย่างอาหารก่อนกินและหลังกินที่สุ่มมาในแต่ละสัปดาห์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในตู้ hot air oven จากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารที่ผ่านการหาความชื้นมาแล้วไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันความชื้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองนำอาหารที่เก็บไว้ของแต่ละซ้ำมารวมกันแล้วทำการสุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 1990) ทำการหาเถ้า โดยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไขมันหรือสารสกัดอีเทอร์ (ether extract, EE) โดยใช้เครื่อง Soxhlet auto analyser เยื่อใย (crude fiber, CF) โดยใช้เครื่อง Fibertec auto analyser และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) โดยใช้เครื่อง Kjeltac auto analyser

ทำการสุ่มไก่กระทรงฆ่าและกลุ่มการทดลองละ 30 ตัว ทำการฆ่าเชื้อและ และทำการตัดแยก ชั่งน้ำหนัก เนื้อส่วนสะโพก น่อง หน้าอก

ก่อนทำการฆ่าเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจาก brachial vein ของไก่แต่ละตัว นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยง และแยกเซรุ่มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซรุ่มไป

วิเคราะห์หา total protein, albumin, glucose, urea, cholesterol และ triglycerides โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Roche BM 911, Hitachi Medical System, U.S.A.)

ข้อมูลทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลอง completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1998)

4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

ตารางที่ 4.1 แสดงส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารไก่กระตังที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งทำการประกอบสูตรและผสมอาหารไก่กระตังโดยเป็นไปตามคำแนะนำของ NRC (1994)

Table 4.1 Ingredient and calculated nutrient composition of basal diets (as-fed basis).

	Composition
Ground corn	60.00
Soybean meal	20.00
Fish meal	8.50
Sunflower meal	5.00
Soybean oil	5.00
Dicalcium phosphate	1.00
Premix ¹	0.50
	100.00
Metabolizable energy (kcal/kg)	3267
Crude protein (%)	20.1
Crude fat (%)	7.94
Crude fiber (%)	9.36
Calcium (%)	0.99
Phosphorus (%)	0.60
Arginine (%)	1.30
Lysine (%)	1.11
Methionine + cystine (%)	0.72
Tryptophan (%)	0.25
Valine (%)	1.05
Threonine (%)	0.79

¹Premix (kilogram diet): vitamin A, 400 IU; vitamin D₃, 250 IU; vitamin E, 30 mg; vitamin C, 30 mg; vitamin K₃, 13 mg; vitamin B₁ 10 mg; vitamin B₂ 16 mg; vitamin B₆ 12 mg; vitamin B₁₂ 0.1 mg; Ca pantothenate 60 mg; folic acid 0.2 mg; nicotinic acid 83 mg; choline 105 mg; Co 0.4 mg; Cu 3.7 mg; I 0.5 mg; Mn 86 mg; Mg 108 mg; Zn 62 mg; Fe 42 mg; Ca 11 mg; Na 390 mg; Cl 671 mg; K 78 mg; Met 45 mg

ผลของการเสริมยีสต์ต่ออัตราการเจริญเติบโต

ผลของการเสริมยีสต์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของไก่กระทงในช่วงอายุ 21-42 วัน กล่าวคือ กลุ่มการทดลองที่ 1 คืออาหารไก่กระทงที่ไม่ได้เสริมยีสต์ กลุ่มการทดลองที่ 2 คืออาหารไก่กระทงที่เสริม AFB₁ 250 ppb กลุ่มการทดลองที่ 3 คืออาหารไก่กระทงที่เสริม AFB₁ 250 ppb + ยีสต์ทางการค้า 2.5×10^7 cells และกลุ่มการทดลองที่ 4 คืออาหารไก่กระทงที่เสริม AFB₁ 250 ppb + ยีสต์จากกระเพาะโค 2.5×10^7 cells พบว่า ปริมาณการกินได้เฉลี่ยต่อตัวต่อวันในแต่ละกลุ่มการทดลองมีค่าเท่ากับ 98.57, 96.19, 101.90 และ 100.47 กรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อตัวต่อวันที่คำนวณได้ มีค่าเท่ากับ 62.21, 53.28, 60.87 และ 61.03 กรัมต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ จะพบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยไก่กระทงในกลุ่มการทดลองที่ 2 (เสริม 250 ppb AFB₁) มีอัตราการเจริญเติบโตวันต่ำที่สุด และต่ำกว่า กลุ่มการทดลองที่ 1, 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ทางด้านของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นพบว่าในกลุ่มการทดลองที่ 2 จะมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยกว่าในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ดังนี้ 1279, 1091, 1263 และ 1270 กรัม ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) กล่าวคือ มีการเพิ่มน้ำหนักตัวต่ำกว่า กลุ่มการทดลองที่ 1, 3 และ 4 และในส่วนของประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร ของไก่กระทงในกลุ่มการทดลองที่ 2 มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารน้อยกว่าในกลุ่มการทดลองที่ 1 กลุ่มการทดลองที่ 3 และกลุ่มการทดลองที่ 4 คือ 1.63, 1.89, 1.7 และ 1.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ส่วนอัตราการตายของไก่ พบว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 มีอัตราการตายสูงสุด (1.4%) และสูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ ในขณะที่กลุ่มการทดลองที่ 1 มีอัตราการตายต่ำที่สุด (0.6%)

การที่ไก่ได้รับสารพิษจากเชื้อรา โดยเฉพาะ aflatoxin ที่ปนเปื้อนในอาหาร จะมีผลทำให้ลดการกินอาหาร ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารต่ำ น้ำหนักตัวลดลง และทำให้ไก่เจ็บป่วยได้ง่าย นอกจากนี้ยังลดประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007; Morgavi and Riley, 2007; Pestka, 2007; Voss and Haschek, 2007) ซึ่งนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Huwig et al., 2001; Wu, 2004; Wu, 2006)

ในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 ได้มีการผลิตยีสต์มีชีวิตทางการค้าจาก *S. cerevisiae* ซึ่งในช่วงแรกนั้นมีวัตถุประสงค์ของการเสริมยีสต์มีชีวิตเพื่อเพิ่มโภชนะและเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของไก่กระทง และยังพบว่าสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวของไข่ไก่พันธุ์ (McDaniel, 1991) งานวิจัยต่อมาพบว่ายีสต์มีชีวิตมีความสามารถในการจับสารพิษหลายชนิดในอาหารไก่ (Devegowda et al., 1994, 1998a 1998b และ 1998c)

Biernasiak et al., (2006) รายงานว่า การใช้จุลินทรีย์ดักจับสารพิษประสบความสำเร็จอย่างมากในการจัดการการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์ เขายังสรุปว่า *S. cerevisiae* และ lactic acid bacteria มีคุณสมบัติในการดักจับสารพิษได้เป็นอย่างดี ทั้ง aflatoxin (B1, B2, G1, G2) และ ochratoxin A นอกจากนี้ *S. cerevisiae* ยังมีความสามารถในการจับสารพิษในรูปแบบต่างๆ ที่มีผลต่อสุขภาพสัตว์และประสิทธิภาพการผลิตสัตว์ จากการศึกษาจำนวนมาก สรุปได้ว่าการดักจับสารพิษของ *S. cerevisiae* เป็นผลมาจากการจับยึดสารพิษของพื้นผิวของผนังเซลล์ยีสต์ และยังมีรายงานว่าผนังเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วก็มีคุณสมบัตินี้เช่นเดียวกัน องค์ประกอบของ mannan ในผนังเซลล์ยีสต์มีความสามารถอย่างมากในการดักจับ aflatoxins, ochratoxin A และ T-2 toxins (Biernasiak et al., 2006) นอกจากคุณสมบัติในการดักจับสารพิษของ *Saccharomyces cerevisiae* แล้ว ยังสามารถเป็นแหล่งโภชนา โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็น วิตามิน และแร่ธาตุ ซึ่งล้วนแต่เป็นโภชนาที่สำคัญต่อสุขภาพและประสิทธิภาพการผลิตสัตว์

Table 4.2 Effect of yeast supplementation on performances of broilers.

	Treatments				SEM	Pr>F
	Control	250 ppb AFB ₁	CY + 250 ppb AFB ₁	BY + 250 ppb AFB ₁		
ADFI (g)	98.57	96.19	101.90	100.47	0.07	0.305
BWG (g)	1279a	1091c	1263b	1270ab	0.09	0.008
FCR	1.63b	1.89a	1.70b	1.66b	0.06	0.002
ADG (g/ day)	62.21a	53.28b	60.87a	61.03a	2.30	0.016
Mortality (%)	0.6c	1.4a	0.8b	0.8b	0.03	0.003

CY = commercial yeast; BY = bovine yeast; SEM = standard of the mean; ADFI = Average dairy feed intake;

BWG = Body weight gain; FCR = Feed conversion ratio; ADG = Average dairy gain

ผลของยีสต์ต่อคุณภาพซาก

การเสริมยีสต์ลงในอาหารของไก่กระທงที่มีสาร AFB₁ ไม่ทำให้ไก่กระທงมีน้ำหนักที่มีชีวิตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เปอร์เซนต์ซาก อยู่ในช่วง 66.89-67.65% ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ผลของการเสริมยีสต์ลงในอาหารของไก่กระທงที่มีสาร AFB₁ ต่อน้ำหนักตัวของไก่กระທง พบว่าไก่กระທงทุกกลุ่มการทดลองมีเปอร์เซนต์ดับ เท่ากับ 2.15, 2.42, 2.14 และ 2.22% ตามลำดับ

และมีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้องเท่ากับ 1.88, 1.99, 1.75 และ 1.65% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทั้งเปอร์เซ็นต์ตับและเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้องนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4.3)

ผลของการเสริมยีสต์ลงในอาหารของไก่กระทงที่มีสาร AFB₁ ต่อน้ำหนักชิ้นส่วนของไก่กระทง พบว่าเปอร์เซ็นต์น้องเท่ากับ 14.5, 14.0, 14.5 และ 14.1% ในกลุ่มการทดลองที่ 1 – 4 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์น้องนั้นพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนเปอร์เซ็นต์สะโพกมีค่าเท่ากับ 18.8, 18.6, 19.2 และ 18.8% ตามลำดับ ออกมีค่าเท่ากับ 21.1, 21.2, 21.1 และ 20.9% ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์สะโพก ออก จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 4.3 Effects of yeast supplementation on live weight and percentages of carcass, liver, abdominal fat, drumstick, thigh and breast.

	Treatments				SEM	Pr>F
	Control	250 ppb	CY + 250	BY + 250		
		AFB ₁	ppb AFB ₁	ppb AFB ₁		
Body weight (g)	1900	1817	1949	1885	0.09	0.390
% Carcass	67.65	66.89	67.04	67.35	0.93	0.775
% Liver	2.15b	2.42a	2.14b	2.22b	0.06	0.006
% Abdominal fat	1.88ab	1.99a	1.75bc	1.65c	0.10	0.009
% Drumstick	14.5a	14.0c	14.5ab	14.1bc	0.13	0.027
% Thigh	18.8	18.6	19.2	18.8	0.39	0.385
% Breast	21.1	21.2	21.1	20.9	0.37	0.930

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นนั้นจะเห็นว่ายีสต์ลงในอาหารของไก่กระทงที่มีสาร AFB₁ มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของไก่กระทงโดยทำให้น้ำหนักตัวไก่ไม่ลดลง อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารไม่ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่กระทงที่ได้รับการเสริมยีสต์ลงในอาหารของไก่กระทงที่มีสาร AFB₁ นั้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อตัวต่อวันและน้ำหนักตัวเท่ากับในกลุ่มควบคุม การวิจัยในไก่กระทงที่เสริมยีสต์ หรือผนังเซลล์ของยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อน aflatoxin (Celyk et al., 2003 และ Santin et al., 2003) แสดงให้เห็นว่าการเสริมยีสต์ในอาหารสามารถลดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราได้ Borji (2010) ให้ความเห็นว่า การเสริมยีสต์ในอาหารจะช่วยลดการเกิดผลเสียของสารพิษในด้านน้ำหนัก

ตัว การกินได้อาหาร และอัตราการเปลี่ยนอาหาร เปอร์เซ็นต์จะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีรายงานผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสริมยีสต์ต่อผลผลิตของไก่ (Hayat et al., 1993; Bradley and Savage, 1995; Stanley et al., 2004a; Zhang et al., 2005) ที่ระดับการเสริมที่เหมาะสม การเสริมยีสต์มีชีวิตในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน aflatoxin จะช่วยปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนอาหาร การเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตเนื่องจากการเสริมยีสต์มีชีวิตไม่ได้เกิดขึ้นจากการเพิ่มการกินได้อาหาร ยีสต์มีชีวิตประกอบด้วยเซลล์ยีสต์ สารเมแทบอลิท์ กลิ่น และสารให้กลิ่น และอาจมีสารเร่งการเจริญเติบโตที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ ที่ช่วยให้สัตว์ตอบสนองต่อผลผลิตที่ได้ในไก่กระตัง (Zhang et al., 2005) อย่างไรก็ตาม การศึกษาอื่นๆ รายงานว่าการเสริมยีสต์มีชีวิตไม่มีผลต่อสมรรถนะการผลิตในไก่วงวง (Bradley and Savage, 1995) และในลูกสุกรหย่านม (White et al., 2002) ความแตกต่างต่อการตอบสนองอาจเกี่ยวข้องกับการใช้ยีสต์มีชีวิตที่แตกต่างกัน เช่น active dried yeast, live YC หรือ fermented YC ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบระหว่างการทดลองที่ต่างกัน ภายใต้สภาวะเครียด ยีสต์มีชีวิตจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตไก่กระตังที่ได้รับ aflatoxin (Stanley et al., 2004b) นอกจากนี้ สภาวะแวดล้อมของการทดลองน่าจะมีอิทธิพลต่อการเสริมยีสต์มีชีวิต การศึกษาครั้งนี้ทำการเลี้ยงดูไก่กระตังในเล้าที่มีการถ่ายเทอากาศได้สะดวก และมีสภาวะที่อาจทำให้เกิดความเครียดน้อย การศึกษาในอนาคตต่อไปควรศึกษาผลของการเสริมยีสต์มีชีวิตภายใต้สภาวะเครียด เนื่องจาก สุขภาพ และสภาพแวดล้อม

ผลของการเสริมยีสต์ต่อค่าทางโลหิตวิทยา

การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน aflatoxin ไม่มีผลต่อระดับ total protein, albumin, blood urea nitrogen และ glucose ในเลือด (ตารางที่ 4.4) อย่างไรก็ตาม การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน aflatoxin ช่วยทำให้ cholesterol และ triglycerides ในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ไก่กระตังที่ได้รับ aflatoxin โดยไม่ได้เสริมยีสต์จะมีความเข้มข้นของ cholesterol และ triglycerides ในเลือดลดลง (ตารางที่ 4.4) ในทางตรงกันข้าม Borji (2010) รายงานว่า ความเข้มข้นของ glucose, cholesterol, triglyceride, albumin และ uric acid ในไก่กระตังที่ได้รับการเสริมยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin จะสูงกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ผลของการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับ Maurice et al. 1983. ซึ่งพบว่า plasma cholesterol ลดลงที่ระดับการให้ 100 $\mu\text{g/kg BW}$ การที่ plasma cholesterol ลดลงนั้นเกิดจากสาเหตุของการลดลงของการสังเคราะห์ไขมัน (Donaldson et al., 1972) และการรบกวนการขนถ่ายไขมัน (Tung et al., 1972) ในไก่กระตังที่ได้รับ AFB₁ นอกจากนี้ Kato et al. (1969) ยังพบว่า plasma cholesterol ลดลงเนื่องจากการยับยั้ง hepatic cholesterol biosynthesis ในหนูที่ได้รับ AFB₁

Table 4.4 Effects of yeast supplementation on blood parameters

	Treatments				SEM	Pr>F
	Control	250 ppb AFB ₁	CY + 250 ppb AFB ₁	BY + 250 ppb AFB ₁		
Total protein (g/dL)	3.37a	3.04b	3.30a	3.50a	0.09	0.390
Albumin (g/dL)	1.50	1.41	1.55	1.83	0.16	0.243
Cholesterol (mg/dL)	132.89a	115.32b	127.94ab	123.46ab	3.91	0.031
Triglycerides (mg/dL)	105.94a	91.13b	115.99a	112.78a	3.28	0.036
Blood urea nitrogen (mmol/L)	1.62	1.98	1.85	1.79	0.09	0.294
Glucose (mmol/L)	8.32	9.33	8.50	8.46	1.10	0.761

4.5 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของการเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน AFB₁ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับ aflatoxin และศึกษาสมรรถภาพการผลิต เช่น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน ปริมาณการกินได้เฉลี่ยต่อตัวต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร นอกจากนี้ยังศึกษาเปอร์เซ็นต์ซาก สะโปก ออก น่อง ดับ และไขมันในช่องท้อง รวมทั้งความเข้มข้นของสารต่างๆ ในเลือด ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า

1. การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน AFB₁ พบว่า ยีสต์มีชีวิต ทั้งยีสต์ทางการค้าและยีสต์จากกระเพาะโคมีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้มากกว่าผนังเซลล์ยีสต์ยีสต์ *Saccharomyces* มีประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้ดีกว่ายีสต์ *Candida sp.*

2. การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน AFB₁ พบว่าผลทำให้การกินได้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อน AFB₁ จะทำให้การกินได้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามไก่ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายน้อยที่สุด

3. การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระตังที่มีการปนเปื้อน AFB₁ พบว่า ไม่ทำให้น้ำหนักตัวเปอร์เซ็นต์ซาก น่อง และออกแตกต่างกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ แต่กลุ่มที่ไม่ได้เสริมยีสต์ในอาหารที่มีการปนเปื้อน AFB₁ ทำให้เปอร์เซ็นต์ตับและเปอร์เซ็นต์ไขมันช่องท้องเพิ่มขึ้น และมีเปอร์เซ็นต์น่องต่ำที่สุด

4. การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระทองที่มีการปนเปื้อน AFB₁ พบว่าไม่มีผลต่อระดับ total protein, albumin, blood urea nitrogen และ glucose ในเลือด การเสริมยีสต์ในอาหารไก่กระทองที่มีการปนเปื้อน aflatoxin ช่วยทำให้ cholesterol และ triglycerides ในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ไก่กระทองที่ได้รับ aflatoxin โดยไม่ได้เสริมยีสต์จะมีความเข้มข้นของ cholesterol และ triglycerides ในเลือดลดลง

เอกสารอ้างอิง:

- กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. (2546). พระราชบัญญัติ ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2546. ชาญยุทธ ชาญเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ. (2538). ผลของ aflatoxin ต่อสัตว์เลี้ยง. สัตว์เศรษฐกิจ. 12(268): 73-76.
- ภักดิ์ เล็กศรีสมพงษ์. (2540). สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์. ใน แปลงศรี อิงคินันท์ (บรรณาธิการ). การประชุมทางวิชาการในวาระ 80 ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ระหว่าง วันที่ 13-14 มีนาคม 2540 (หน้า 83-89). กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- Asplin, F. D. and Carnaghan, R. B. A. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Rec. 73: 1215.
- Biernasiak J., Piotrowska M., Libudzisz Z. (2006). Detoxification of mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens. Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Technical University of Lodz, Poland. *Mycotoxin Research* Vol. 22, (2006) No. 4, 230-235
- Borji, M. 2010. The effects of zeolite and yeast in managing aflatoxicosis in broiler chicks. Proceedings of the 3rd International e-Conference on Agricultural BioSciences 2010, p. 51; Abstract.
- Bradley, G. L., and T. F. Savage. 1995. The effect of autoclaving a yeast culture of *Saccharomyces cerevisiae* on turkey poult performance and the retention of gross energy, and selected minerals. Anim. Feed Sci. Technol. 55:1-7.
- Carnaghan, R. B. A., Lewis, G, Patterson, D. S. P. and Allcroft, R. (1966). Biochemical and pathological aspects of groundnut poisoning in chickens. Pathologia Veterinaria, 3: 601-615.

- Celik, K., Uzatici, A. and Akin, A. E. 2008. Effects of Dietary Humic Acid and *Saccharomyces cerevisiae* on Performance and Biochemical Parameters of Broiler Chickens. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 3(5): 344-350.
- Celyk, M. Denly and T. Savas, Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets, Revista Brasileira de Zootecnia 32 (2003), pp. 615–619.
- Clifford, J. I. and Rees, K. R. (1966). Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. Nature, Lond. 209: 312.
- Clifford, J. I. and Rees, K. R. (1967). The interaction of aflatoxins with purines and purine nucleosides. Biochem. J. 103: 467.
- Dawson, K.A., Evans, J., Kudupoje, M., 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. In: T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds.) Science and Technology in the Feed Industry. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 169-181.
- Devegowda, G., Aravind, B.I.R. Rajendra, K. Morton, M.G. Baburathna, A. and Sudarshan, C. (1994). A biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. In T. P. Lyons and K. A. Jacques (eds.). Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 10th Ann. Symp. (pp. 241-255). Leics, UK: Nottingham University.
- Devegowda, G., M. V. L. N. Raju, N. Afzali and Swamy, H. V. L. N. 1998a. Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction. Feed Compounder, 18 (6) : 22-27.
- Devegowda, G., M.V.L.N. Raju, N. Afzali and Swamy, H.V.L.N. 1998b. Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction. In: Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium (T. P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, Nottingham. pp. 241-255.
- Devegowda, G., M.V.L.N. Raju and Swamy, H.V.L.N. 1998c. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. Feedstuffs. 70 (50): 12-17.
- Donaldson, W. E., Tung, H. T. and Hamolton, P. B. 1972. Depression of fatty acid synthesis in chick (*Gallus domesticus*) liver by aflatoxin. Comp. Biochem. Physiol. 41B:843-847.
- Fink-Gremmels, J. and Malekinejad, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone.

- Hayat, J., T. F. Savage, and L. W. Mirosh. 1993. The reproductive performance of two genetically distinct lines of medium white turkey hens when fed breeder diets with and without a yeast culture containing *Saccharomyces cerevisiae*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:291–301.
- Huwig A., Freimund S., Käppeli O. and Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122 (2, 20): 179-188.
- Kato, R., Onoda, K. and Omori, Y. 1969. Effect of aflatoxin B₁ on the incorporation of ¹⁴C-acetate into cholesterol by rat liver. *Experientia*. 25:1026.
- Kemel ML, Perez S, Godeheu G, Soubrie P, Glowinski J. 2002. Facilitation by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine after acute and chronic suppression of dopaminergic transmission in the matrix of the rat striatum. *J Neurosci* 22:1929–1936.
- Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., 1999. In vitro and in vivo testing of adsorbents for detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In: T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds.) *Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 369-379.
- Maurice, D. V., Bodine, A.B. and Rehner, N. J. 1983. Metabolic effects of low aflatoxin B₁ levels on broiler chicks. *Appl. Envi. Microbiol.* 45(3):980-984.
- McDaniel, G. (1991). Effects of Yea-sacc 1026 on reproductive performance of broiler breeder males and females. In Lyons, T.P. (ed.). *Biotechnology in the feed industry*. Proc. Alltech's 7th Ann. Symp. Alltech technical publication, Kentucky U.S.A.
- Morgavi, D.P., Riley, R.T. 2007. *Fusarium* and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control, and economic impact. *Animal Feed Science And Technology*. 137:199-200.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. Ninth Revised Edition, National Academy Press. Washington , D.C.
- Parlat, S. S., Ozcan, M. and Oguz, H., 2001. Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Res. Vet. Sci.* 71, 207-211.
- Pestka J. J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Technol* 137:283–298.

- Santin, A.C. Paulilo, A. Maiorka, L.S.O. Nakaghi, M. Macan and A.V.F. de Silva et al., Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers, *International Journal of Poultry Science* 2 (2003), pp. 241–344.
- Scott, P. M. (1990). Natural Poisons. In Helrich, K. (ed.). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (15th ed., pp. 1184-1213). Virginia: Arlington.
- Singleton, P. (1992). *Introduction of bacteria for students of biology biotechnology and medicine*. England: John Wiley & Sons.
- Stanley, V. G., C. Gray, M. Daley, W. F. Krueger, and A. E. Sefton. 2004a. An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp.-infected litter. *Poult. Sci.* 83:39–44.
- Stanley, V. G., M. Winsman, C. Dunkley, T. Ogunleye, M. Daley, W. F. Krueger, A. E. Sefton, and A. Hinton Jr. 2004b. The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. *J. Appl. Poult. Res.* 13:533–539.
- Statistical Analysis System. (1998). *SAS user' guide: Statistics*. NC: SAS Institute
- Trucksess, M. W., Stack, M. E. Nesheim, S., Albert, R. and Romer, T. 1994. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of AFB₁, B₂, G₁ and G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 77:1512-1521.
- Tung, H. T., Donaldson, W. E. And Hamilton, P.B. 1972. Altered lipid transport during aflatoxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22:97-104.
- Voss, K.A., Haschek, W.M., 2007. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. In: Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. Anim. Feed Sci. Technol.
- White, L. A., M. C. Newman, G. L. Cromwell, and M. D. Lindemann. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 80:2619–2628.
- Wogan, G. N. and Friedman, M. A. (1968). Inhibition by AFB₁ of hydrocortisone induction of rat liver tryptophan pyrrolase and tyrosine transaminase. *Archs Biochem. Biophys.*, 128: 509.
- Wu, F. 2004. Mycotoxins risk assessment for the purpose of setting International Regulatory Standards, *Environ. Sci. Technol.* 38 (15): 4049–4055.

- Wu, F. 2006. Economic impact of fumonisin and aflatoxin regulations on global corn and peanut markets.. In: D. Barug, D. Bhatnager, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen and A. Visconti, Editors, *The Mycotoxin Factbook. Food & Feed Topics.*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Yiannikouris, A., Jouany, J.-P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* 51, 81–99.
- Yildiz, A. Ö., Parlat, S. S. and Yazgan, O. 2004. The Effects of Organic Chromium Supplementation on Production Traits and Some Serum Parameters of Laying Quails. *Revue M d. V t.*, 155 (12): 642-646.
- Zhang, A. W., B. D. Lee, S. K. Lee, K. W. Lee, G. H. An, K. B. Song, and C. H. Lee. 2005. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poult. Sci.* 84:1015–1021.